

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Кафедра Медицинской биологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Е. И. Шишацкая
подпись инициалы, фамилия
«_____» _____ 2016 г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

«Применение метода анализа полиморфизма длин рестрикционных
фрагментов для исследования различий в нуклеотидных
последовательностях ампликонов гена 16S рРНК бактерий»

06.03.01 Биология

Научный руководитель _____ О.А. Гусейнов
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ С.Е. Степанов
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2016

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1 Генетическая система бактерий.....	5
1.2 Идентификация бактерий.....	7
1.3 Ген 16S-рибосомальной РНК.....	8
1.4 Полимеразная цепная реакция.....	9
1.5 Рестрикция ДНК.....	12
1.6 Электрофорез ДНК.....	15
1.7 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.....	20
1.8 Анализ <i>insilico</i>	22
1.9 Используемые образцы бактерии.....	22
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	24
2.1 Методика выделения ДНК.....	24
2.2 Проведение полимеразной цепной реакции.....	24
2.3 Проведение реакции рестрикции.....	26
2.4 Проведение электрофореза.....	27
2.5 Методика очистки ДНК ампликонов.....	28
3 РЕЗУЛЬТАТЫ.....	29
3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий.....	29
3.2 Получение ампликонов гена 16S-рРНК.....	30
3.3 Проведение рестрикции ампликонов 500L – 1350R.....	33
3.4 Проведения анализа <i>insilico</i>	34
3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных.....	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	39
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	40

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Исследование микроорганизмов невозможно без распознавания их принадлежности к тем или иным биологическим родам и видам. Процесс идентификации является важным этапом проведения биологических исследований.

Ранее работы по классификации бактерий основывались на морфологических и физиологических признаках чистых культур. В последние 30 лет возможности для идентификации бактерий расширились в связи с использованием молекулярно-генетических методов [1].

Наибольший прогресс в филогении микроорганизмов был достигнут благодаря секвенированию генов. В частности, секвенирование генов 16S-рРНК и 23S-рРНК, а также анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов других генов позволили пересмотреть родственные взаимоотношения между разными бактериями [2,3].

Применение молекулярно-генетического подхода для идентификации микроорганизмов выявило его преимущества по сравнению с традиционным подходом: оно открыло возможность определять некультивируемые организмы. Возникла возможность с помощью единой методологии осуществлять построение филогенетических древ [4].

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов маркерных ампликонов является одним из наиболее простых методов идентификации бактерий. Для идентификации некоторых микроорганизмов требуется несколько суток, а то и недель. Используя метод анализа ПДРФ результат можно получить в течении дня.

В представленной работе показана применимость метода анализа ПДРФ для идентификации почвенных бактерий.

Цель работы: Используя метод анализа ПДРФ, выявить различия в нуклеотидных последовательностях ампликонов гена 16S-rРНК почвенных бактерий и сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.

Исходя из данной цели, были поставлены следующие **задачи**:

1. Из биомассы почвенных бактерий выделить ДНК и получить ампликоны гена 16S-rРНК используя пары праймеров 500L – 1350R.
2. Для полученных ампликонов провести реакции рестрикции используя следующий набор рестриктаз: TaqI, HhaI, BspFNI, AfaI, BstHNI.
3. Провести электрофорез продуктов гидролиза и проанализировать полученные электрофореграммы.
4. Провести изучение *in silico* ампликонов гена 500L – 1350R 16S-rРНК методом анализа ПДРФ с использованием данных GenBank, и построить теоретические электрофореграммы.
5. Сравнить теоретические и практические электрофореграммы и сделать вывод о видовой принадлежности бактерий.

Работа выполнена на кафедре Медицинской биологии Института Фундаментальной Биологии и Биотехнологии.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Генетическая система бактерий

Генетический аппарат, или нуклеоид, является эквивалентом ядра у бактерий. Нуклеоид, состоит из одной замкнутой в кольцо или линейной молекулы ДНК. Структура ДНК представлена антипараллельной двойной правозакрученной спиралью [5].

ДНК прокариот значительно отличается от структурной организации эукариотической ДНК: нуклеоид бактерий не имеет ядерной оболочки, ядрышка и основных белков гистонов (имеются гистоподобные белки - HU, H-NS, IHF, которые участвуют в компактизации ДНК). Геном компактен, количество некодирующих последовательностей ДНК минимально, гены не несут интронов (за исключением архебактерий). Гены – дискретные участки на ДНК, отличаются числом и специфичностью последовательности нуклеотидов, в которых зашифрована информация о структуре и свойствах белков. Каждому белку соответствует свой ген. Для кодирования белков часто используются 2 или 3 рамки считывания одной и той же последовательности ДНК, что повышает кодирующий потенциал генома без увеличения его размера [6]. В клетках бактерий и архей кольцевые или линейные молекулы ДНК прикреплены изнутри к клеточной мембране. Вся ДНК клетки (и хромосомная, и плазмидная) образует геном клетки. Обычно в бактериальной клетке содержится одна хромосома, но бывает и несколько. Длина бактериальной ДНК около 5 млн. п.н., молекула ДНК в развернутом виде может достигать более 1 мм, то есть почти в 1000 раз превышать длину бактериальной клетки. Было установлено, что хромосомы прокариот представляют собой высокоупорядоченную структуру, часть ДНК в этой структуре представлена системой из 20 - 100 независимо суперспирализованных петель. Хромосомы большинства прокариот имеют молекулярную массу в пределах $1-3 \times 10^9$ Да. Содержание пар оснований А+Т

и Г+Ц в молекуле ДНК является постоянным для данного вида организма и служит важным диагностическим признаком [7].

Второй компонент бактериального генома – это плазмиды. Плазмиды – это кольцевые ДНК длиной до нескольких тысяч пар оснований. Число их в каждой клетке колеблется [8]. Плазмиды – автономно реплицирующиеся внехромосомные генетические элементы. Как правило, они представляют собой кольцевые молекулы ДНК. В отличие от хромосом плазмиды являются «необязательным» генетическим материалом, потеря которого не приводит к гибели клетки. Однако многие крупные плазмиды содержат гены, кодирующие важные для клетки функции, которые могут оказаться необходимыми в определенных экологических условиях. Приобретаемые с плазмидами новые признаки в ряде случаев определяют названия плазмид: например, F-плазида (fertility factor), придающая клеткам донорные свойства, или R-плазида, определяющая резистентность клеток к антибиотикам [9].

Геномы прокариот являются динамичными структурами даже в пределах одного вида. И исходя из внутривидовой вариабельности геномов сложились представления о базовом и гибком вспомогательном наборе генов. Консервативный базовый набор включает гены так называемого «домашнего хозяйства», ответственные за информационные системы репликации, транскрипции, трансляции, ключевые пути метаболизма и формирования клеточных структур, определяющих родовую принадлежность. В категорию вспомогательных входят операционные гены, контролирующие разные процессы метаболизма и морфофизиологические признаки, обеспечивающие приспособленность к определенной экологической нише. Многие из таких генов локализованы в плазмидах, мобильных элементах, геномных островках, которые не обязательно присутствуют во всех штаммах одного вида [10].

1.2 Идентификация бактерий

Бактерии формируют многочисленные виды и благодаря своей природе многовариантны и, как следствие, значимы для современной человеческой цивилизации. Они отличаются своей многогранностью, и люди пытаются использовать этот феномен в своей практической жизни. Бактерии активно используются в разных отраслях промышленности (металлургической, пищевой, фармацевтической, сельскохозяйственной) [11]. Некоторые виды являются важнейшими представителями микробиоты организма человека необходимыми для поддержания гомеостаза системы «человек - окружающая среда» (в частности бактерии родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*) [12]. Но, некоторые бактерии могут вызывать тяжелые заболевания [13]. Поэтому очень важно правильно идентифицировать микроорганизмы.

Идентификация микроорганизмов основывается на изучении морфологических, цитологических, культуральных, физиолого-биохимических и молекулярно-генетических свойств.

Начиная с постулатов Коха идентификация бактерий сводилась к выделению чистых культур с последующей идентификацией фенотипическими тестами, к основным из которых можно отнести микроскопию по Граму и анализ ферментации углеводов. Эти методы были не всегда пригодны для точного и достоверного определения бактерий по следующим причинам. В бактериологической практике встречаются культуры, биохимический профиль которых не соответствует характеристикам предполагаемого рода или вида; не все бактерии растут на средах, используемых при анализе; достоверная идентификация редко встречаемых видов бактерий требует наличие химических реагентов или иммунологических тестов, которые могут быть недоступны. Поэтому, в практику вошли новые методы, основанные на генетических данных [14]. Универсальной системой идентификации по генетической информации является анализ нуклеотидной последовательности гена 16S-rРНК. Метод начал развиваться в 1980-х годах, когда С. Woese с сотрудниками,

установили, что, филогенетические отношения бактерий могут быть определены при сравнении высоко консервативной части генетического кода [15].

Для идентификации используют и другие гены, например ген 18S-rРНК [16]. Также используют область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) между 16-S рРНК и 23-S рРНК. ITS-регион является полиморфным в нуклеотидных последовательностях и, как правило, содержит гены транспортной РНК. Часто используют некоторые белок-кодирующие гены [17].

В тех исследованиях, которые основаны на генетическом анализе, точность и надежность филогенетического определения возрастает, поскольку существует возможность проанализировать больше генетической информации. Однако, этот вид анализа имеет свои недостатки, поскольку он требует проведения большего числа дорогостоящих молекулярно-генетических анализов, в частности, ПЦР и секвенирования, по сравнению с использованием одного генетического маркера. Преимущества гена 16S-рРНК среди всех остальных маркеров заключается в его успешном применении в любом молекулярно-генетическом исследовании [17].

1.3 Ген 16S-рибосомальной РНК

Как говорилось ранее, для характеристик состава микробных сообществ используются как микробиологические методы, предполагающие получение чистых культур микроорганизмов и их характеристику, так и молекулярные методы идентификации микроорганизмов по нуклеотидным последовательностям маркерных генов, без их культивирования [18,19].

Самым распространенным маркерным геном бактерий является ген 16S рибосомальной РНК. Ген 16S-рРНК находится в малой субъединице рибосом прокариот (30S). У него есть как консервативные, так и переменные участки нуклеотидной последовательности, что позволяет использовать его как для определения рода, так и видовой идентификации микроорганизмов.

Консервативные участки практически идентичны у всех микроорганизмов и используются для отжига праймеров при ПЦР, а вариабельные или видоспецифичные участки могут использоваться для идентификации микроорганизмов [20,21].

Ген 16S-rРНК малой субъединицы рибосомы важен для оценки эволюционных отношений между бактериями, поскольку он эволюционирует медленно и его продукт жизненно важен и функционально консервативен. Внутри одного вида сходство гена 16S-rРНК достигает 98–99% последовательности нуклеотидов.

Последовательности гена 16S-rРНК известны для огромного количества бактерий и представлены в свободном доступе в генетических базах данных, таких как GenBank. Это позволяет сравнивать полученные последовательности с уже имеющимися, и тем самым идентифицировать микроорганизмы [22].

1.4 Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция – это метод молекулярной биологии, который позволяет добиться значительного увеличения копий определенного фрагмента ДНК в биологическом материале. Метод изобрёл американский биохимик Кэрри Маллисом в 1983 году [23].

Метод ПЦР широко используется во всех областях биологии и медицины: молекулярной диагностике (детекции микроорганизмов и вирусов, анализе экспрессии генов, выявлении индивидуальных генетических особенностей), а также в молекулярном клонировании, секвенировании и в других молекулярно-генетических исследованиях [23,24].

ПЦР - искусственный процесс многократной амплификации специфической последовательности ДНК, осуществляемый *in vitro*.

Копирование ДНК при ПЦР осуществляется специальным ферментом – ДНК-полимеразой, как и в клетках живых организмов. ДНК-полимераза, двигаясь по одиночной цепи ДНК-матрице, синтезирует комплементарную ей последовательность ДНК. Важно, что ДНК-полимераза не может начать синтез цепи ДНК «с нуля», ей необходима короткая «затравочная» цепь – олигонуклеотидный праймер, к которой она может начать присоединять нуклеотиды. Специфичность ПЦР определяется способностью праймеров «распознавать» строго определенный участок ДНК и связываться с ним согласно принципу, молекулярной комплементарности [25].

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее $0,1^{\circ}\text{C}$. Современные амплификаторы позволяют задавать сложные программы, в том числе с возможностью «горячего старта», и последующего хранения амплифицированных молекул при 4°C . Для ПЦР в реальном времени выпускают приборы, оборудованные флуоресцентным детектором. Существуют также приборы с автоматической крышкой и отделением для микропланшет, что позволяет встраивать их в автоматизированные системы.

Для проведения ПЦР в простейшем случае требуются следующие компоненты:

- ДНК-матрица, содержащая тот участок ДНК, который требуется амплифицировать.
- Два праймера (затравки, необходимые для инициации синтеза ДНК), комплементарные противоположным концам разных цепей требуемого фрагмента ДНК.
- Термостабильная ДНК-полимераза — фермент, который катализирует реакцию полимеризации ДНК. Полимераза для использования в ПЦР должна сохранять активность при высокой температуре длительное время, поэтому используют ферменты, выделенные из термофилов — *Thermusaquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcusfuriosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcuswoesei* (Pwo-полимераза) и другие [26,27].

- Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы.
- Буферный раствор, обеспечивающий необходимые условия реакции — pH, ионную силу раствора. Содержит соли, бычий сывороточный альбумин.

- В пробирку добавляют высококипящее масло, например, вазелиновое, чтобы избежать испарения реакционной смеси. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется

Вся технология ПЦР состоит из трех этапов:

- I этап— подготовка матрицы, которая включает выделение и очистку ДНК или РНК, определение их концентрации, оценку качества матрицы, синтез комплементарной ДНК (кДНК) (в том случае, когда в качестве исходной матрицы выступает РНК), концентрирование (при необходимости повышения чувствительности детекции);

- II этап— амплификация или собственно ПЦР;
- III этап— разделение и визуализация (детекция) продуктов реакции с помощью аналитическогогель-электрофореза или иных инструментальных методов разделения и детекции нуклеиновых кислот.

Собственно, ПЦР состоит из многократно повторяющихся циклов (как правило, 25-35) амплификации, каждый из которых включает три раунда: денатурация (расплетение) двухцепочечных фрагментов ДНК, “отжиг” (присоединение) праймеров к матрице и элонгация (удлинение праймеров).

Первый этап предусматривает нагрев реакционной смеси до температуры, при которой большинство двухцепочечных фрагментов ДНК будут денатурированы и ДНК распадется на отдельные цепи. При этом температура и продолжительность температурной обработки реакционной смеси подбираются так, чтобы основная часть молекул ДНК-полимеразы

осталась в неактивированном состоянии (обычно от +93°C до +96°C, 30-120сек.).

На втором этапе каждого цикла ПЦР реакционная смесь охлаждается до температуры, оптимальной для комплементарного спаривания праймеров со специфическим участком одноцепочечной ДНК-матрицы (обычно от +37°C до +65°C). Праймеры – это короткие (как правило, 18-30 нуклеотидов) химически синтезированные олигодезоксирибонуклеотиды, являющиеся инициаторами синтеза цепи ДНК с помощью ДНК-полимеразы. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание цепи происходит только между ними. Сайты (места) посадки праймеров на ДНК-матрице и определяют размер того участка ДНК, который будет амплифицирован.

Наконец, на третьем этапе происходит синтез комплементарных цепей ДНК, который иницируется праймерами, идет в направлении 5'→3' и катализируется ДНК-полимеразой. Материалом для синтеза новых цепей ДНК служат дезоксирибонуклеотидтрифосфаты, добавляемые в реакционную смесь. Продолжительность этапа амплификации составляет, в среднем, 20-40сек. и определяется скоростью работы полимеразы и размером того фрагмента ДНК, который нужно синтезировать (обычно от нескольких сотен до 5-6 тыс. нуклеотидов) [28].

1.5 Рестрикция ДНК

Эндонуклеазы рестрикции, рестриктазы — группа ферментов, относящихся к классу гидролаз, катализирующих гидролиз фосфодиэфирных связей чужеродных ДНК в большинстве прокариотических (бактерии и сине-зеленые водоросли) и некоторых других организмах и выполняющие тем самым "иммунную" функцию – системы рестрикции-модификации [29,30].

Это ферменты, «узнающие» определенные последовательности в двухцепочечной ДНК. Их выделяют преимущественно из прокариотических клеток [31].

В отличие от экзонуклеаз, рестриктазы эндонуклеазы расщепляют нуклеиновые кислоты не с конца молекулы, а в середине. При этом каждая рестриктаза узнаёт определённый участок ДНК длиной от четырёх пар нуклеотидов и расщепляет нуклеотидную цепь внутри участка узнавания или вне него.

К 2007 году было выделено более трех тысяч эндонуклеаз рестрикции. Более тысячи рестриктаз доступны в виде коммерческих препаратов и повседневно используются в лабораториях для модификации ДНК и решения генно-инженерных задач [31].

Различают 3 основных класса рестриктаз:

Рестриктазы первого типа (например, EcoR из *Escherichiacoli* K12) узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двухцепочную молекулу ДНК неподалёку от этой последовательности в произвольной точке и само место разреза не строго специально [32].

Рестриктазы второго типа (например, EcoRI) узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль ДНК в определённой фиксированной точке внутри этой последовательности. Рестриктазы этого типа узнают палиндромальные последовательности, которые обладают центральной осью и считываются одинаково в обе стороны от оси симметрии.

Рестриктазы третьего промежуточного типа (например, EcoPI) узнают нужную последовательность и разрезают двухцепочную молекулу ДНК, отступив определённое число нуклеотидных пар от её конца (или в нескольких точках на разном удалении от сайта узнавания). При этом образуются фрагменты ДНК либо с ровными (тупыми) концами, либо с выступающими (липкими) 5'- или 3'-концами. Эти рестриктазы узнают асимметричные сайты [32].

Также рестриктазы делят на *мелко-* и *крупнощепящие*. Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. К мелкощепящим относятся рестриктазы Hpa II и Alu (из *Arthrobacterluteus*), к крупнощепящим - Eco R I (из *Escherichiacoli*) и Hind III [33].

Для каждого фермента рестрикции существуют оптимальные условия реакции, которые приводятся в описании, прилагаемом фирмой-изготовителем. Основные переменные параметры – это температура инкубации и состав буфера. К температурному режиму предъявляются достаточно жесткие требования, тогда как различия между буферами чаще всего лишь незначительны.

Рестрикционный анализ ДНК широко используется в молекулярно-биологических исследованиях и прикладных работах и является одним из наиболее важных инструментов при изучении ДНК. При помощи эндонуклеаз рестрикции можно исследовать ДНК различных вирусов, бактерий, животных, растений [34,35,36,37].

Как правило, продукты расщепления ДНК анализируются с помощью гель-электрофореза в агарозном или акриламидном геле, а полученная таким образом картина разделения фрагментов ДНК в виде определенного, отличающегося для разных ферментов, набора полос и является результатом рестрикционного анализа той или иной ДНК [38].

Короткие фрагменты мигрируют намного быстрее, чем длинные. При сравнительно высокой концентрации агарозы большие фрагменты вообще не могут проникнуть в гель. В процессе миграции рестрикционные фрагменты не деградируют, их можно вымывать в виде биологически активных двухцепочечных молекул. При окрашивании гелей красителями, связывающимися с ДНК, выявляется набор полос, каждая из которых отвечает рестрикционному фрагменту, молекулярную массу которого можно

определить, проведя калибровку с помощью ДНК с известными молекулярными массами.

При использовании нескольких эндонуклеаз рестрикции на одном образце можно составлять рестрикционные карты. Располагая такой информацией, можно идентифицировать на ДНК биологически важные участки. Поскольку рестрикционная карта отражает расположение определенной последовательности нуклеотидов в данном участке, сравнение таких карт для двух или более родственных генов позволяет оценить гомологию между ними. Анализируя рестрикционные карты, можно сравнивать определенные участки ДНК разных видов животных без определения их нуклеотидной последовательности. Таким образом, например, было установлено, что хромосомные участки, кодирующие цепи гемоглобина у человека, орангутанга и шимпанзе сохранились в практически неизменном виде в течение последних 5 - 10 млн. лет [38].

Метод рестрикционного картирования позволяет увидеть крупные генетические изменения, такие как делеции или инсерции. При этом происходит уменьшение или увеличение рестрикционных фрагментов, а также исчезновение или возникновение сайтов рестрикции.

1.6 Электрофорез ДНК

Электрофорез — это перемещение частиц дисперсной фазы в жидкой или газообразной среде под действием внешнего электрического поля. Впервые был открыт профессорами Московского университета П. И. Страховым и Ф. Ф. Рейссом в 1809 году. Электрофорез является одним из наиболее важных методов для разделения и анализа компонентов веществ в химии. Этот метод находит широчайшее применение для разделения смесей биомолекул на фракции или индивидуальные вещества. Он используется в биохимии, молекулярной биологии, клинической диагностике [29].

В начале 70-х годов было показано, что с помощью гель-электрофореза можно определить длину и чистоту молекул ДНК, а также разделить и

выделить нужные фрагменты. Этот метод прост, так как каждый нуклеотид в молекуле нуклеиновой кислоты обладает отрицательным зарядом, который движется к положительному электроду. Чтобы разделить молекулы ДНК, исходя из их размера, электрофорез проводят в гелях. Были разработаны специальные гели, с помощью которых удастся разделить фрагменты ДНК длиной до 500 нуклеотидов, отличающиеся всего лишь на несколько нуклеотидов: полиакриламидные, агарозные. Поскольку поры в полиакриламидном геле для больших молекул ДНК слишком малы, то для разделения молекул ДНК по размеру были разработаны специальные гели на основе агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей). Оба эти метода разделения ДНК (в полиакриламидном геле и агарозном геле) широко используются для аналитических и препаративных целей [29].

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники можно быстро разделить такие смеси фрагментов ДНК, которые не могут быть разделены другими способами, например, центрифугированием в градиенте плотности [39].

Агарозный гель-электрофорез используется для разделения молекул ДНК по размеру, определения размера фрагментов ДНК с помощью маркеров. Электрофорез позволяет определения примерное количество ДНК по яркости свечения полос ДНК в ультрафиолетовом свете благодаря окрашиванию геля бромистым этидием. Просматривая прокрашенный гель в ультрафиолетовом свете, можно заметить даже 1 нг ДНК.

Разделение фрагментов ДНК происходит из-за наличия у них заряда. Фосфатные остатки у нуклеотидов имеют отрицательный заряд, благодаря чему ДНК движется под действием электрического тока от анода к катоду. Напряженность электрического поля при разделении в агарозных гелях составляет 1 – 8 В/см [40,41].

Компоненты электрофореза в агарозном геле:

Агароза. Агароза, природный коллоид, который выделяют из морских водорослей, является линейным полисахаридом (средняя молекулярная масса ~12 000 Да. Агароза очень хрупка, и легко разрушается при манипулировании. Агарозные гели имеют «поры» большого размера и используются преимущественно для разделения больших молекул с молекулярной массой большей, чем 200 кДа.

Разделение в агарозных гелях происходит быстро, но с ограниченным разрешением, так как полосы, образующиеся в агарозных гелях, имеют тенденцию размываться/диффундировать и распространяться в стороны. Это является результатом большого размера пор и не может быть предотвращено. Агарозные гели получают суспендированием сухого порошка агарозы в водном буфере, и кипячением смеси до того момента, когда агароза расплавится и образует прозрачный раствор. Затем раствор наливают на подложку и дают остыть до комнатной температуры, чтобы сформировался прочный гель. При застывании агароза формирует матрикс, плотность которого определяется концентрацией.

Фрагмент ДНК заданного размера перемещается в геле на различные расстояния в зависимости от концентрации агарозы. При соответствующих концентрациях агарозы и/или буфера возможно разделить сегменты ДНК, содержащие от 20 до 50000 н.п. (нуклеотидных пар).

Обычно используются агарозные гели с концентрацией агарозы от 0.7% до 3%

Буфер для электрофореза. На электрофоретическую подвижность ДНК воздействуют состав и ионная сила буфера для электрофореза. В буфере с высокой ионной силой электропроводность очень эффективна, и образуется значительное количество тепла. В худшем случае, гель расплавляется и ДНК денатурирует.

Существует несколько буферов для электрофореза нативной двухцепочечной ДНК. Они содержат EDTA (pH 8.0) и Tris-ацетат (ТАЕ), Tris-борат (ТВЕ), или Tris-фосфат (ТРЕ) в концентрации

приблизительно 50 мМ (рН 7.5 - 7.8). Буферы для электрофореза обычно готовят в виде концентрированных растворов и хранят при комнатной температуре.

ДНК маркеры. При заданном напряжении, концентрации агарозного геля и буфера, расстояние перемещения зависит от молекулярного веса исходного материала. Поэтому, маркерная ДНК известного размера должна наноситься на дорожки и с левого, и с правого края геля. Маркер обычно содержит определенный набор известных сегментов ДНК, которые облегчают определение размера исследуемой ДНК, если какое-либо систематическое искривление геля возникнет во время электрофореза.

Буфер для нанесения. Образцы ДНК, которые будут наноситься на агарозный гель, сначала смешивают с буфером для нанесения, обычно содержащим воду, сахарозу и краситель (например, ксиленианол, бромфеноловый синий, бромкрезол зеленый и др.). Максимальное количество ДНК, которое может быть нанесено, зависит от числа фрагментов. Минимальное количество ДНК, которое может быть выявлено на снимках геля, окрашенного бромистым этидием, составляет около 2 нг в полосе, шириной 0.5 см. Если в полосе такой ширины находится более 500 нг ДНК, значит дорожка перегружена, что приводит к размыванию полосы.

Буфер для нанесения используется для трех целей:

- Увеличение плотности образца для обеспечения попадания ДНК в лунку
- Добавления красителя к образцу, чтобы облегчить процесс нанесения
- Добавление к образцу такого красителя, который в электрическом поле будет двигаться в сторону анода на предсказуемое расстояние [42].

Скорость миграции ДНК через агарозный гель при электрофорезе определяется пятью главными параметрами

Размер молекул ДНК. Чем больше молекула ДНК, тем медленнее она перемещается в геле

Концентрация агарозы. Фрагменты ДНК перемещаются в геле, содержащем разные концентрации агарозы, с разными скоростями. Таким образом, применяя гели разных концентраций, можно разделить большой набор фрагментов ДНК, различающихся по размеру.

Конформация ДНК. ДНК, имеющие одинаковую молекулярную массу, но разные конформации, например, кольцевая неповрежденная (форма I), кольцевая с одноцепочечным разрывом (форма II) и линейная (форма III), движутся в агарозном геле с разными скоростями. Чаще всего линейная форма (форма III) мигрирует медленнее всех.

Напряженность электрического поля. При низких напряженностях скорость перемещения фрагментов линейной ДНК пропорциональна приложенному напряжению. Однако с увеличением напряженности электрического поля подвижность фрагментов ДНК с высокой молекулярной массой дифференциально возрастает. Следовательно, с увеличением напряженности область эффективного разделения ДНК в агарозном геле снижается. Максимальное разделение фрагментов происходит при напряженности, не превышающей 5 В/см. При большом напряжении и малой концентрации агарозы может возникнуть краевой эффект, когда крайние дорожки начнут изгибаться. При таком эффекте общий электрофоретический профиль выглядит как выпуклая линза [43].

Состав оснований и температура. Электрофоретическое поведение ДНК в агарозных гелях слабо зависит от состава оснований ДНК или температуры геля. В агарозных гелях в области температур от 4 до 30°C изменения относительной электрофоретической подвижности фрагментов ДНК разного размера не наблюдается. Обычно электрофорез в агарозных гелях ведут при комнатной температуре.

Наиболее удобный метод визуализации ДНК в агарозных гелях – окрашивание ее флуоресцирующим красителем бромистым этидием.

Молекула этого вещества содержит плоскую группу, которая интеркалирует между соседними основаниями ДНК. В результате такой интеркаляции в непосредственной близости от оснований краситель связывается с ДНК, что сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции. УФ-излучение, поглощаемое ДНК в области 260 нм и передаваемое на краситель (или же излучение, поглощаемое самим красителем при длинах волн 302 и 366 нм), испускается затем в красно-оранжевой области видимого спектра (590 нм). Обычно раствор бромистого этидия добавляют и в гель, и в электрофоретический буфер. В его присутствии электрофоретическая подвижность линейной двухцепочечной ДНК снижается примерно на 15%, но зато при этом появляется возможность наблюдать за процессом разделения непосредственно под источником УФ-излучения во время или в конце разделения. Можно также проводить электрофорез в отсутствие бромистого этидия и окрашивать ДНК уже после завершения разделения. В последнем случае гель помещается в электрофорезный буфер или воду, содержащие бромистый этидий, на 30 мин при комнатной температуре. Бромистый этидий является сильным мутагеном. Все манипуляции с гелями и растворами, содержащими краситель, необходимо проводить в перчатках [44].

1.7 Анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) — это способ исследования геномной ДНК, путем разрезания ДНК с помощью эндонуклеаз рестрикции и дальнейшего анализа размеров, образующихся рестриктов путем гель-электрофореза [45].

При использовании данного исследования получают различные результаты от различных образцов, и при помощи анализа полиморфизма длин фрагментов рестрикции можно идентифицировать некоторые различия в последовательности нуклеотидов ДНК, в случае, когда они располагаются в сайте рестрикции.

Наличие сайтов рестрикции в геномной ДНК и их взаимное расположение однозначно определяются последовательностью нуклеотидов, исследуемой ДНК, поскольку сам сайт рестрикции — не что иное, как строго определенная последовательность нуклеотидов ДНК, узнаваемая и расщепляемая рестриктазами. Следовательно, любая мутация, изменяющая последовательность нуклеотидов сайта рестрикции, уничтожает этот сайт. Полное расщепление анализируемой геномной ДНК отдельными рестриктазами приводит к образованию определенного набора фрагментов ДНК, число и размеры которых соответствуют расположению сайтов рестрикции. Мутационная изменчивость в сайтах рестрикции может быть легко обнаружена по изменению длины рестрикционных фрагментов ДНК. При наличии мутации в одном из сайтов рестрикции этот сайт остается нерасщепленным после завершения рестрикции, что приводит к слиянию соседних рестрикционных фрагментов ДНК, разделяемых мутантным сайтом, и образованию фрагмента ДНК большего размера. В результате длина рестрикционных фрагментов ДНК, содержащих мутантные сайты, становится полиморфной, что выявляется при сравнении ДНК из разных источников методом ПДРФ [46].

Полиморфизм ДНК в нашем случае — это наличие вариабельности в последовательности нуклеотидов в одном и том же гене (выполняющем те же функции) у близкородственных видов. Полиморфизм вызывается несколькими причинами: точечными мутациями в виде единичных нуклеотидных замен, ошибками при репликации ДНК в виде инсерций или делеций протяжённостью от одного до сотен или тысяч нуклеотидов, крупными делециями, вставками, транслокациями, транспозициями мобильных генетических элементов и т. п. Все изменения в первичной структуре ДНК ведут к изменениям в длине фрагментов, образующихся под воздействием рестриктаз.

1.8 Анализ *insilico*

Insilico – термин, обозначающий компьютерную симуляцию эксперимента, чаще биологического. Фраза была создана по аналогии с фразами *in vivo* (в живом организме) и *in vitro* (в пробирке), которые часто используются в биологии.

С помощью компьютерного моделирования анализируют нуклеиновые кислоты и аминокислотные последовательности, производят выравнивание последовательностей, поиск гомологичных последовательностей ДНК, РНК и белков, построение филогенетических карт, используя специальное программное обеспечение. Осуществляют такие манипуляции как: теоретические амплификацию, рестриктирование, электрофорез. Геномы могут иметь длину до нескольких миллиардов пар нуклеотидов. Данный метод позволяет анализировать различные геномы за короткое время, осуществлять поиск нужных последовательностей ДНК, РНК, белков и работать с ними.

В настоящее время имеется огромное количество генетических данных, находящихся в открытом доступе на специализированных порталах. Математическая, аналитическая и программная обработка данных последовательностей имеет явное преимущество перед экспериментальными исследованиями в области трудоемкости, стоимости и времени [47].

Применение биоинформационного подхода позволяет планировать и моделировать эксперименты для того чтобы снизить вероятность ошибки в ходе практического эксперимента, а также снизить количество ресурсов.

1.9 Используемые образцы бактерии

Кишечная палочка - *Escherichia coli*. Грамотрицательная бактерия, факультативный анаэроб, не образует эндоспор. Клетки палочковидные, со слегка закруглёнными концами, размером 0,4 - 0,8 до 1 - 3 мкм. Широко встречается в нижней части кишечника теплокровных организмов. Большинство штаммов *E. coli* являются безвредными, однако некоторые могут

вызывать тяжёлые пищевые отравления у людей. Безвредные штаммы являются частью нормальной флоры кишечника человека и животных и могут выполнять симбиотические функции. Кишечная палочка может приносить пользу организму хозяина, например, синтезируя витамин К, а также предотвращая развитие патогенных микроорганизмов в кишечнике.

Наличие *E.coli* в окружающей среде является важным индикатором состояния окружающей среды. Эти бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому кишечная палочка играет важную роль в биотехнологии и генетических исследованиях. *E.Coli* является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов в практической микробиологии [48,49,50,51,52].

Водородокисляющая бактерия - *Ralstonia eutropha* *R.eutropha* является водородокисляющей бактерией, способной к росту на границе анаэробных и аэробных условиях, может легко адаптироваться между гетеротрофным и автотрофным образом жизни. В качестве источника энергии может использовать органические соединения и водород. *R.eutropha* может использовать аэробное дыхание или анаэробное дыхание. *R.eutropha* производит биопластик полигидроксиалканоат (ПГА) пластмасс при выращивании в избыточном количестве углеводного субстрата. При этом ПГА может накапливаться до уровня примерно 90% от сухого веса клетки. Используемый штамм: B5786 грамотрицательная литоавтотрофная бактерия *Ralstonia eutropha* B 5786, которая использует CO₂ и H₂ в качестве источников углерода и энергии в отсутствии энергетического субстрата [53].

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Методика выделения ДНК

Выделение бактериальной геномной ДНК при помощи набора AxyPrepBacterialGenomicDNAminiprepKit и входящей в состав набора инструкцией. Методика выделения основана на эффективном выходе геномной ДНК посредством специального лизисного буфера GA (лизисный буфер). После этого быстрое отделение геномной ДНК от протеинов, полисахаридов и липидов достигается уникальным фазоразделительным шагом при добавлении буфера DV. Высокоочищенная геномная ДНК находится в нижней фазе. Затем нижнюю фазу с растворённой в ней ДНК наносят на фильтр и центрифугируют. На фильтре оседают оставшиеся белки, липиды и полисахариды, а также клеточные стенки бактерий. Следующим шагом раствор ДНК наносят на колонку, где ДНК связывается с ней благодаря буферу BV (ДНК связывающий буфер). Центрифугируют один раз после добавления промывочного буфера W1 и два раза после добавления буфера W2. Центрифугируют 2 минуты при 12000 оборотах. Это делают для того чтобы очистить ДНК от нежелательных молекул и солей, которые могли пройти через фильтр. Очищенная бактериальная ДНК элюируется с колонки элюентом (2.5 mM Tris-HCl, pH 8.5.) буфером [54].

2.2 Проведение полимеразной цепной реакции

При постановке реакции ПЦР для 10 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 11 образцов:

Для получения ампликонов ограниченных последовательностями праймеров:

500 L – 5'-CGTGCCAGCAGCCGCGGTAA-3'

1350 R – 5'-GACGGGCGGTGTGTACAAG-3'

- 297 мкл H₂O_(дист)
- 55 мкл буфера

- 55 мкл dNTP
- 33 мкл + 33 мкл праймеров
- 33 мкл $MgCl_2$

Все компоненты смеси были смешаны в 1 пробирке. В отдельные 10 пробирок добавил по 46 мкл данной смеси и по 2 мкл исследуемой ДНК бактерий. Смесь готовил на ледяной подставке.

После горячего старта, на втором шаге, добавили по 2 мкл фермента ДНК-полимеразы.

Программа ПЦР:

1. 95°C – 2 мин;
2. 80°C – 2 мин;
3. 95°C – 0:10 сек;
4. 64°C – 0:15 сек;
5. 72°C - 1:00 мин;
6. GO TO 3 35 times;
7. 72°C – 4:00;
8. 4°C – 18:00:00ч;
9. END

Далее продукты амплификации подверглись электрофорезу.

Проведенный электрофорез ампликонов ДНК показал, что реакция ПЦР прошла успешно, были выделены участки ДНК гена 16S-rРНК длиной около 900 пар оснований.

Амплификацию проводили на приборе Bio-rad - MJMiniPersonalThermalCycler

2.3 Проведение реакции рестрикции

Реакцию проводили в 50 мкл реакционной смеси. При постановке реакции рестрикции для 10 проб сначала была приготовлена смесь с запасом на 11 образцов для каждой рестриктазы. Смесь готовили на ледяной подставке.

- 308мкл воды
- 55 мкл SE буфера (для каждой рестриктазы свой буфер)
- 55 мкл BSA
- 11 мкл фермента рестриктазы

В отдельные 10 пробирок было добавлено по 40 мкл из общей смеси и 10 мкл ДНК ампликонов исследуемых бактерий.

Время реакции рестрикции - 2 часа. Температура для каждой рестриктазы выставлялась разная.

Рестрикцию проводили в термостате Eppendorf – ThermoStatplus

Для визуализации результатов рестрикции продукты реакции подвергались электрофорезу в агарозном геле.

В работе использовали рестриктазы фирмы «SibEnzyme»

Рестриктаза	Сайт узнавания	Используемый буфер	Оптимальная температура, °C	Температура инактивации, °C
Afa I	5'-GT [^] AC-3' 3'-CA [^] TG-5'	SE буфер B	37	80
BstHI I	5'-GCG [^] C-3' 3'-C [^] GCG-5'	SE буфер R	50	80
BspFI I	5'-CG [^] CG-3' 3'-GC [^] GC-5'	SE буфер Y	37	65
Hha I	5'-GCG [^] C-3' 3'-C [^] GCG-5'	SE буфер Y	50	80
Taq I	5'-T [^] CGA-3' 3'-AGC [^] T-5'	SE буфер Y	65	80

Все использованные рестриктазы имеют тетрануклеотидный сайт узнавания, что позволяет получать от 3 до 7 фрагментов ДНК в результате расщепления продукта амплификации, имеющего длину порядка 900 п.о.

2.4 Проведение электрофореза

- Реактивы:
- 0,85 г агарозы для получения 1,7% геля
- 50 мл электрофорезного буфера TBE
- ДНК Маркеры
- Буфер для нанесения пробы
- Вода
- Образцы ДНК

Агарозу смешивали с буфером для электрофореза, полученную смесь нагревали и кипятили 1 минуту в СВЧ-печи пока не образовалась равномерная суспензия. Полученную суспензию охлаждали до 60°C. В форму для агарозы заранее была установлена гребенка куда после остывания была залита охлажденная суспензия. Форму с гелем оставляли на 30 минут для застывания. Пока гель застывал необходимые пробы ДНК, и праймеры смешивали в отдельном планшете. После того как гель затвердел, гребенка аккуратно извлекалась и подложку с гелем перемещали в электрофорезную кювету. Необходимо следить за тем, чтобы сторона геля с лунками куда будут вноситься пробы ДНК была со стороны анода. В лунки помещались пробы ДНК и по бокам ДНК Маркеры. После добавления проб гель заливали электрофорезным буфером, так чтобы гель был закрыт слоем буфера толщиной 1-2 мм. Электрофорезную камеру закрывали и присоединяли электроды к источнику напряжения. Напряженность при проведении электрофореза составила 80V в течении 2-х часов. По окончании разделения подложку с гелем вынимали и помещали в красящий раствор бромистого этидия (1 мкг/мл). После 30 мин. прокрашивания подложку вместе с гелем промывали в дистиллированной воде в течение 2 минут. Далее гель

помещали в трансиллюминатор гель-документирующей системы и рассмотрели гель в проходящем ультрафиолетовом свете.

Необходимое оборудование для проведения электрофореза:

1. Источник питания Bio-RadPowerPacHV (1-400 Вт, 0,01-500 мА, 20-5000 В)
2. Камера для горизонтального электрофореза (гель 7x10) Mini-SubCellGT, Bio-Rad.

Гель-документирующая система Bio-RadGelDocXRс компьютером.

2.5 Методика очистки ДНК ампликонов

Очистку ампликонов проводил с помощью набора фирмы IsogeneLaboratoryDiatomTM DNA Clean-Up.

Набор для простого и эффективного выделения ДНК из биологических образцов основан на избирательной сорбции ДНК на поверхности стеклянных шариков в присутствии высокой концентрации хаотропного агента. Процесс сорбции ДНК проводится в объеме, а выделение ДНК - в микропробирке типа эппендорф. Выделенная ДНК используется в молекулярно-биологических реакциях без дополнительной очистки. Набор предназначен для элюции 100 образцов ПЦР продуктов объемом до 100 мкл и содержанием ДНК не более 20 мкг или 50 образцов ДНК объемом 200 мкл и содержанием ДНК не более 40 мкг, или большего объема ПЦР продукта при соблюдении объемных пропорций компонентов набора.

Далее можно сразу приступить к работе с очищенной ДНК или хранить ее в течении длительного времени при -20°C.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Выделение ДНК из образцов бактерий

Из девяти образцов почвенных бактерий и двух маркерных штаммов *Escherichiacoli*K-12 и *Ralstoniaeutropha*B-5786 была выделена геномная ДНК высокого качества. (Таблица 1)

Таблица 1 - концентрация и чистота полученной ДНК

№ Пробы	Концентрация разведение в 10 раз, мкг/мл	Исходная концентрация, мг/мл	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	43	0,43	1,97
2	37	0,37	1,95
3	46	0,46	1,94
4	39	0,39	1,96
5	35	0,35	1,96
6	30	0,3	1,95
7	41	0,41	1,97
8	40	0,4	1,96
9	34	0,34	1,93
<i>Escherichiacoli</i> K- 12	41	0,41	1,98
<i>Ralstoniaeutropha</i>	37	0,37	1,96

Все образцы были пригодны для дальнейших исследований, так как отношение $A_{260}:A_{280}$ у этих образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0.

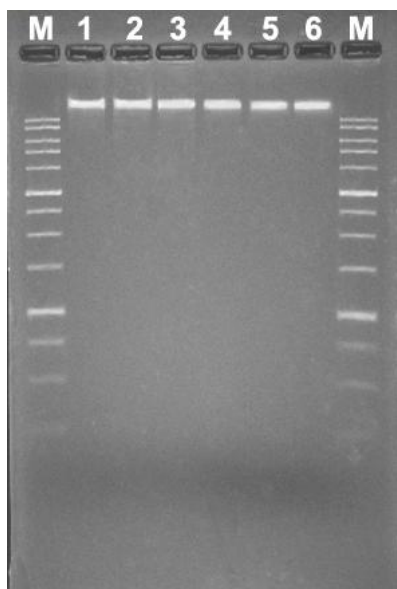


Рисунок 1 - суммарная геномная ДНК бактерий

М – ДНК маркер 1kb

1 – 5 – Исследуемые образцы бактерий

6 – *Ralstonia eutropha*

На рисунке 1 представлен результат электрофореза выделенной ДНК исследуемых бактерий, а также ДНК *Ralstonia eutropha* В-5786. Остальные исследуемые образцы показали сходную картину электрофореза. Масса выделенной суммарной ДНК составила более 10 000 п.о.

3.2 Получение ампликонов гена 16S-pРНК

С использованием выделенной ДНК были получены ампликоны, которые соответствуют выбранному участку гена 16S-pРНК. Это участки, ограниченные последовательностями, комплементарными последовательностям праймеров 500L и 1350R. После амплификации ампликоны были подвергнуты очистке с использованием набора Diatom DNA Clean-Up от праймеров, dNTP и полимеразы.

Таблица 2 - Концентрации и чистота полученных ампликонов ДНК

№ Пробы	Концентрация, мг/мл	Чистота препарата $A_{260}:A_{280}$
1	30	1,94
2	27	1,92
3	25	1,91
4	31	1,93
5	35	1,94
6	32	1,93
7	29	1,92
8	26	1,92
9	33	1,94
<i>Escherichia coli</i> K-12	36	1,94
<i>Ralstonia eutropha</i> B-5786	35	1,93

Все образцы ампликонов были пригодны для дальнейших исследований, так как отношение поглощений $A_{260}:A_{280}$ у этих образцов входит в оптимальный диапазон от 1,8 до 2,0.

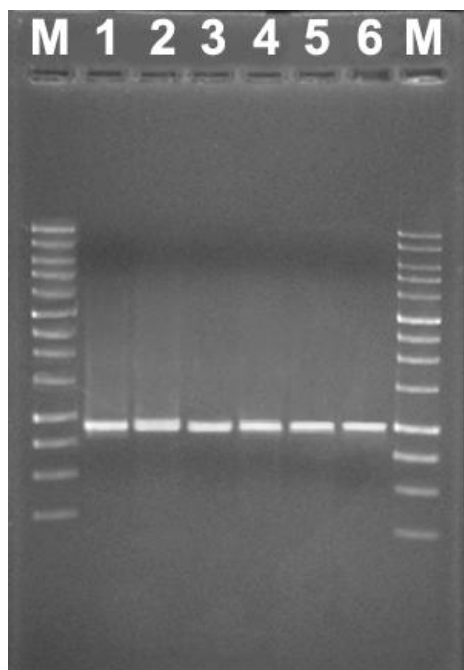


Рисунок 2 – Ампликоны гена 16S-
рРНК бактерий ограниченный
праймерами 500L – 1350R

М – ДНК маркер 1kb

1-5 – Исследуемые образцы бактерий

6 – *Escherichiacoli*K-12

На рисунке 2 представлен результат электрофореза ампликонов гена 16S-рРНК исследуемых бактерий, а также ампликоны *Escherichiacoli*K-12. Образцы, не вошедшие в данные электрофореграммы, показали сходные электрофоретические картины. Масса ампликонов составила около 900 п.о.

3.3 Проведение рестрикции ампликонов 500L – 1350R

Полученные ампликоны были подвергнуты рестриктированию с использованием пяти эндонуклеаз рестрикции: TaqI, HhaI, AfaI, BstHNI, BspFNI.

Таблица 3 – Примерные размеры рестриктов полученные после обработки ампликонов 500L – 1350R эндонуклеазами рестрикции

Образцы бактерий Рестриктазы	<i>Ralstonia Eutropha</i> B 5876	<i>Escherichia coli</i> K-12	1	2, 5	3	4
Afa I	380 350 150	500 380	500 380	380 350 140	500 380	500 380
BstHNI	470 290 70 60	530 190 160	530 300 70	340 300 200 60	600 300	600 300
BspFNI	340 290 100 90 40	340 300 140 100	340 300 140 100	300 200 180 90 70	450 300 90 50	430 380
Hha I	470 290 70 60	530 190 160	530 300 70	340 300 200 60	600 300	600 300
Taq I	450 360 90	360 310 90 85 50	360 180 120 80 80 50	450 440	450 360 80	450 360 80

Таблица 4 – Примерные размеры рестриктов полученные после обработки ампликонов 500L – 1350R эндонуклеазами рестрикции

Образцы бактерий Рестриктазы	6	9	7	8	10
Afa I	360 250 150 120 14	500 380	500 380	360 250 150 130	380 360 150
BstHNI	380 120 100 80 60 50	650 220	390 130 130 120 80	540 100 80 60 50	550 130 100 80
BspFNI	440 260 110 60	440 440	290 170 160 100 90 40	440 260 120 70	390 300 90 50
Hpa I	380 120 100 80 60 50	650 220	390 130 130 120 80	540 100 80 60 50	550 130 100 80
Taq I	450 360 90	450 310 90 50	450 360 90	450 320 90	440 360 90

3.4 Проведения анализа *insilico*

На основании морфологических характеристик образцов бактерий были выбраны семь родов бактерий, к которым могли относиться образцы: *Rhizobium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*. Был проведен рестрикционный анализ *in silico* ампликонов генов 16S-рРНК с помощью программы pDRAW32 - Freeware DNA cloning, analysis and visualization software [52]. После теоретического рестриктирования ампликонов последовательностей, взятых из базы данных GenBank для каждого рода, были выбраны подходящие по рестрикционному профилю виды.

Таблица 5 - размеры рестриктов ампликонов 500L – 1350R полученные после проведения теоретического рестриктирования

Образцы бактерий Рестриктазы	<i>Ralstonia Eutropha</i> <i>B 5876</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>K-12</i>	1	2, 5	3	4
Afa I	380 350 150	500 380	500 380	380 350 140	500 380	500 380
BstHI I	470 290 70 60	530 190 160	530 300 70	340 300 200 60	600 300	600 300
BspFNI	340 290 100 90 40	340 300 140 100	340 300 140 100	300 200 180 90 70	450 300 90 50	430 380
Hha I	470 290 70 60	530 190 160	530 300 70	340 300 200 60	600 300	600 300
Taq I	450 360 90	360 310 90 85 50	360 180 120 80 80 50	450 440	450 360 80	450 360 80

3.5 Сравнение теоретических и экспериментальных данных

После проведения анализа *insilico* были составлены теоретические электрофореграммы, которые мы сравнили с практическими, полученными после электрофоретического разделения продуктов гидролиза ампликонов.

На рисунках 3-12 представлены в сравнении практические и теоретические электрофореграммы продуктов амплификации гена 16S-rPHK почвенных бактерий после обработки ампликонов разными эндонуклеазами рестрикции.

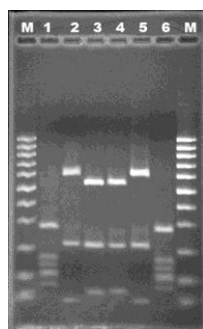


Рисунок 3-
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
BspFNI
М – Маркер 100 bp
1 – Образец 1
2 – Образец 2
3 – Образец 3
4 – Образец 4
5 – Образец 5
6 – *EscherichiacoliK-12*

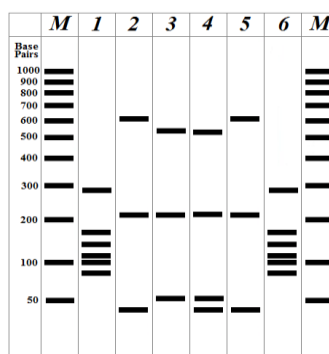


Рисунок 4 -
Теоретически
рассчитанные картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы BspFNI
М – Маркер 100 bp
1 – *K. pneumoniae*
2 – *B. cereus*
3 – *B. amyloliquefaciens*
4 – *B. pumilus*
5 – *B. cereus*
6 – *E.coliK-12*

На данных электрофореграммах наблюдается три типа распределения рестриктов. Это позволило разделить бактерии по близким видам.

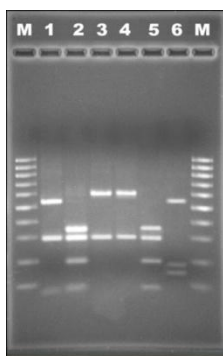


Рисунок 5 -
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
NhaI
М – Маркер 100 bp
1 – Образец 1
2 – Образец 2
3 – Образец 3
4 – Образец 4
5 – Образец 5
6 – *E.coliK-12*

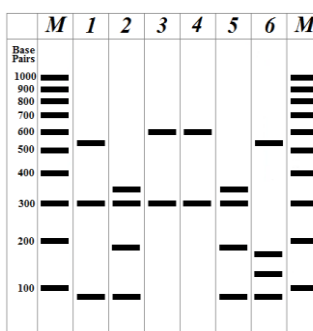


Рисунок 6 -
Теоретически
рассчитанные картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы NhaI
М – Маркер 100 bp
1 –
Klebsiellapneumoniae
2 – *Bacillus cereus*
3 – *Bacillus amyloliquefaciens*
4 – *Bacillus pumilus*
5 – *Bacillus cereus*
6 – *Escherichia coli K-12*

При использовании рестриктазы NhaI у образцов 2 и 5; 3 и 4 наблюдаются одинаковые профили рестрикции. Для 1 образца и *E.coli K-12*

они различны, что не наблюдалось в предыдущих случаях, т.е выявлено их видовое различие.

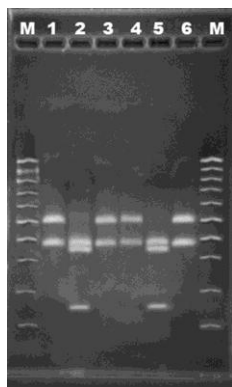


Рисунок 7 -
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
Afa I
M – Маркер 100 bp
1 – Образец 1
2 – Образец 2
3 – Образец 3
4 – Образец 4
5 – Образец 5
6 – *E.coli* K-12

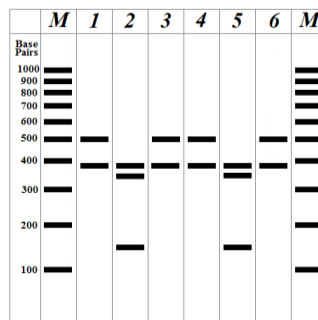


Рисунок 8 -
Теоретически
рассчитанные
картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы Afa I
M – Маркер 100 bp
1 – *K. pneumoniae*
2 – *B. cereus*
3 – *B.*
amyloliquefaciens
4 – *B. pumilus*
5 – *B. cereus*
6 – *E.coli* K-12

На данных электрофореграммах наблюдается всего два типа распределения рестрикто. Одинаковые профили показывают образцы 1, 3, 4 и образец *E.coli* K-12; и образцы 2 и 5. Фермент рестрикции Afa I является менее информативной рестриктазой по сравнению с предыдущей.

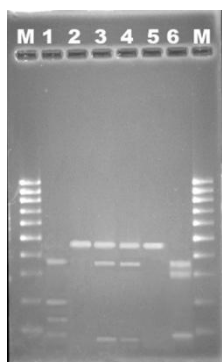


Рисунок 9 -
Электрофоретическое
разделение после
обработки рестриктазой
Taq I
M – Маркер 100 bp
1 – Образец 1
2 – Образец 2
3 – Образец 3
4 – Образец 4
5 – Образец 5
6 – *E. coli* K-12

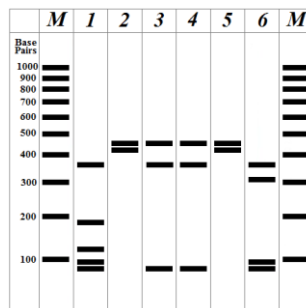


Рисунок 10 -
Теоретически
рассчитанные
картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы TaqI
M – Маркер 100 bp
1 – *K. pneumoniae*
2 – *B. cereus*
3 – *B.*
amyloliquefaciens
4 – *B. pumilus*
5 – *B. cereus*
6 – *E.coli* K-12

При использовании данной рестриктазы удалось различить между собой образцы 1 и *E.coli*K-12. Образцы 2 и 5; 3 и 4 имели одинаковые картины рестрикции.

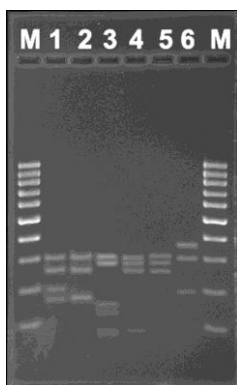


Рисунок 11 –
Электрофоретическое
разделение после
обработки
рестриктазой BstHNI
M – ДНК Маркер 100pb
1 - Образец 8
2 - Образец 6
3 - Образец 9
4 - Образец 7
5 - Образец 10
6 - Образец 2

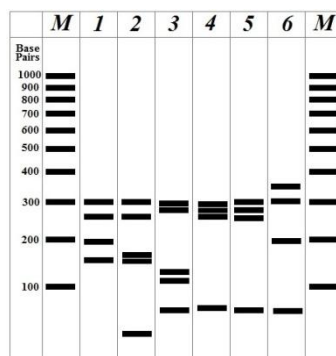


Рисунок 12 -
Теоретически
рассчитанные
картины
электрофоретического
разделения для
рестриктазы BstHNI
M – ДНК
Маркер 100pb
1 - M. luteus
2 - A. globiformis
3 - A. tumefaciens
4 - A. xylosoxidans
5 - P. fluorescens
6 - B. cereus

При использовании рестриктазы BstHNI видим, что у всех образцов наблюдается разный рестрикционный профиль, что позволяет сразу отличить все исследуемые образцы друг от друга.

Исходя из сравнения теоретических и практических электрофореграмм, исследуемые образцы бактерий являются представителями видов:

Образец 7 – *Achromobacter xylosoxidans*

Образец 9 – *Agrobacterium tumefaciens*

Образец 6 – *Arthrobacter globiformis*

Образец 3 – *Bacillus amyloliquefaciens*

Образцы 2 и 5 – *Bacillus cereus*

Образец 4 – *Bacillus pumilus*

Образец 1 – *Klebsiella pneumoniae*

Образец 8 – *Micrococcus luteus*

Образец 10 – *Pseudomonas fluorescen*

Наиболее информативными для определения оказались рестриктазы, NhaI, BspFNI, BstHNI так как при их использовании наблюдаются разные картины распределения рестриктов для всех образцов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом анализа ПДРФ была определена видовая принадлежность 10 образцов почвенных бактерий. В процессе работы была выделена высококачественная ДНК бактерий и проведена ее очистка. Используя полимеразную цепную реакцию были получены ампликоны размером около 900 п.о. гена 16S-rРНК. Был проведен рестрикционный анализ исследуемых ампликонов. Полученные данные были сверены с результатами анализа *in silico* базы данных нуклеотидных последовательностей ДНК (GenBank). По результатам сравнения исследуемые бактерии оказались представителями видов: *Arthrobacter globiformis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas fluorescen*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*.

Была создана база данных для идентификации различных видов бактерий, которая пригодится в определении вида других бактерий в дальнейших исследованиях.

Метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов в совокупности с использованием генетической базы данных секвенированных последовательностей ДНК (GenBank) может служить достаточно простым способом идентификации микроорганизмов. Метод анализа ПДРФ можно использовать для быстрого и малозатратного определения видов микроорганизмов. Он проще определения вида бактерий с использованием других методов идентификации.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

ПГА – полигидроксиалканоаты

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ITS – internaltranscribedspacer, внутренний транскрибируемый спейсер

кДНК – комплементарная ДНК

dATP – дезоксиаденозинтрифосфат

dGTP – дезоксигуанозинтрифосфат

dCTP – дезоксицитидинтрифосфат

dTTP – дезокситимидинтрифосфат

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Горохова, С.С. Основы микробиологии, производственной санитарии и гигиены: Учебное пособие / С.С. Горохова, Н.А. Прокопенко, Н.В. Косолапова. – 4-е изд. стер. – Москва: Академия, 2013 – 64с.
2. Frajman, B. Phylogenetic relationships of *Atocion* and *Viscaria* (Sileneae, Caryophyllaceae) inferred from chloroplast, nuclear ribosomal, and low-copy gene DNA sequences / B. Frajman, N. Heidari, B. Oxelman // *Taxon*. – 2009. – Vol.58, № 3. – p.811-824
3. Rautenberg, A. Geographic and phylogenetic patterns in *Silene* section *Melandrium* (Caryophyllaceae) as inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences / A. Rautenberg, L. Hathaway, B. Oxelman, H.C. Prentice // *Molecular Phylogenetics and Evolution* – 2010. – Vol.57, № 3. – p.978(14)
4. Турова, Т.П. Применение методов геносистематики для решения вопросов таксономии и изучения биоразнообразия прокариот: дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.07 / Турова Татьяна Павловна. – Москва, 2009. – 86с.
5. Лысак, В.В. Л88 Микробиология: учеб. пособие / В. В. Лысак. – Минск: БГУ, 2007. – 000 с.: ил. ISBN 985-485-709-3.
6. Гусев, М.В. Микробиология / М. В. Гусев, Л. А. Минеева. — Москва: Изд-во МГУ, 2004. — 448с.
7. Прунтова, О.В. Курс лекций по общей микробиологии и основам вирусологии. В 2 ч. Ч. 1 / О. В. Прунтова, О. Н. Сахно, М. А. Мазиров; Владим. гос. ун-т. - Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2006. - 192с.
8. Попова, Н.А. Введение в биологию. учеб. пособие / Н. А. Попова. – Новосибирск: Новосиб. гос. университет. – 2012. – 271 с.
9. Квитко, К.В., Захаров И.А. Генетика микроорганизмов: уч. пособие / К.В. Квитко, И.А. Захаров под ред. А.В. Пиневи́ча. – 2-е изд. – Санкт-Петербург: Изд. дом СПб. ун-та, 2012. – 268с.

10. Шестаков, С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий / С.В. Шестаков // Экол. генетика. 2007. Т. 5, № 2. – С. 12–24.
11. Тихонович, И.А., Проворов Н.А. Сельскохозяйственная микробиология как основа экологически устойчивого агропроизводства: фундаментальные и прикладные аспекты / И.А. Тихонович, Н.А. Проворов // С.-х. биология. – 2011. – Т. 3. – С. 3-9.
12. Шейбак, В.М. Микробиом кишечника человека и его влияние на метаболизм / В.М. Шейбак // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2015. – №.2 с.50.
13. Ефимочкина, Н.Р. Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С .28.
14. Куйбагаров, М.А. Генетическая идентификация бактерий коллекционных штаммов на основе проведения анализа нуклеотидной последовательности 16s rRNA гена / М.А. Куйбагаров, А.Б. Шевцов, А.Х.Жумалин, Т.Б. Карибаев, Ж.Ж.Аканова, Е.С. Шевцова // Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина. – 2013. - №2 (77). – С.14-21.
15. Guttel, R. Lessons from an evolving rRNA:16S and 23S rRNA structures from a comparative perspective / R. Guttel, N. Larsen, C. Woese // Microbiological review, 1994. – Т 8, № 1. – Р.10-24.
16. Tanabe, A.S. Comparative study of the validity of three regions of the 18S-rRNA gene for massively parallel sequencing-based monitoring of the planktonic eukaryote community / A.S. Tanabe, S. Nagai, K. Hida, M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura, Y. Takano, S. Katakura // Molecular Ecology Resources, 2016. – Vol. 16 – P. 402–414.

17. Ефимова, К.В. Молекулярная идентификация и особенности генетического разнообразия цианобактерий и одноклеточных водорослей акватории японского моря: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07 / Ефимова Ксения Владимировна. – Владивосток, 2016. – 184с.

18. Chen, L. Rapid Sanger sequencing of the 16S rRNA gene for identification of some common pathogens / L. Chen, Y. Cai, G. Zhou, X. Shi, J. Su, G. Chen, K. Lin // PloS one. – 2014. – Т.9, №. 2. – С. e8888.

19. Кадников, В.В Молекулярный анализ микробных сообществ мест залегания углеводов на дне озера Байкал: автореф. дис. кандидата биологических наук: 03.01.03 / Кадников Виталий Валерьевич. – Москва, 2014. – 48с.

20. Ботина, С.Г. Идентификация промышленных штаммов молочнокислых бактерий методами молекулярно-генетического / С.Г. Ботина // Генетика. – 2006. – Т.42, № 12. – С. 1621-1635.

21. Точилина, А.Г. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / Г.А. Точилина // Микробиология, эпидемиология и иммунобиология. – 2008. – № 3. – С. 69-73.

22. NationalCenterforBiotechnologyInformation – [электронный ресурс]: режим доступа <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (Дата обращения 15.10.2015).

23. Паренков, А.Д. Пособие к практическим занятиям по молекулярной биологии. Часть 2. Методы молекулярной диагностики: учебно-методическое пособие / А.Д. Перенков [и др.]. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет им. И.Н. Лобачевского, 2015. – 44с.

24. Александров, А.А. Применение полимеразной цепной реакции для диагностики и оценки эффективности химиотерапии туберкулеза: автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Александров Андрей Александрович. – Москва. – 94с.

25. Лопухов, Л.В., М.В. Эйдельштейн. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике / Л. В. Лопухов, М. В.

Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2000. – Т.2, № 3. – С. 96 – 106.

26. Патрушев, Л.И. Искусственные генетические системы / Л. И. Патрушев. — Москва: Наука, 2005. — в 2 т. — 276с.

27. Оберемок, В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода / В.В. Оберемок: методические указания. — Симферополь, 2008. — 35с.

28. Гринев, В.В. Введение в технику полимеразной цепной реакции: метод. пособие к лабораторным занятиям по специальному практикуму для студентов биол. фак. / В.В.Гринев. — Минск: БГУ, 2008. — 48с.

29. Pingoud, A. et al. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism / A. Pingoud et al. // Cellular and molecular life sciences. — 2005. — Т. 62, №. 6. — С. 685-707.

30. Чмуж, Е.В. и др. Новая эндонуклеаза рестрикции BslI из *Bacillus subtilis* ТЗО узнает метилированную последовательность ДНК 5'-G (m5C) > 1'NGC-3' / Е. В. Чмуж и др. // Биотехнология. — 2005. — №. 3. — С. 22 — 26.

31. Классификация, номенклатура и характеристика рестриктаз [электронный ресурс] — режим доступа: http://www.biotechnolog.ru/ge/ge3_2.htm (Дата обращения 5.10.2015)

32. Oller, A.R., VandenBroek W., Conrad M., Topal M.D. Biochemistry, 1991, Vol.30, P. 543—549.

33. Абрамова, З.И. Введение в генетическую инженерию: Учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» / З.И.Абрамова. - Казань: Казанский университет, 2008.- 169с.

34. Чернухин, В.А. Сравнительный рестрикционный анализ хромосомной ДНК крысы *in vitro* и *in silico* / и др. В.А. Чернухин, М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, Д.А. Гончар, С.Х. Дягтярев // Вестник биотехнологии. — 2006. — Т.2, №. 3. — С. 39.

35. Белова, Е. Г. Герпесвирусы 6, 7, 8-го типов / Е. Г. Белова, Т. К. Кускова // Лечащий врач. – 2006. – Т.2. – С. 76 – 79.
36. Кравец, А.П. Изменения профиля метилирования ДНК растений пшеницы при хроническом γ облучении семян / А. П. Кравец , Т. А. Мюссе, А. В. Литвинчук , Ш. Остермиллер , Г. С. Венгжен , Д. М. Гродзинский // Цитология и генетика. 2010. – № 5. – С. 18 – 22.
37. Зернов, Ю.П. Использование рестрикционного анализа амплифицированного гена 16S РНК для идентификации микроорганизмов на примере бактериальных продуцентов термолабильной щелочной фосфатазы / Ю. П. Зернов, М. Л. Абдурашитов, С. Х. Дегтярев // Биотехнология. – 2005. – № 6. – С. 3 – 11.
38. Абдурашитов, М.А. Метод рестрикционного анализа геномов млекопитающих *insilico* / М.А. Абдурашитов, В.Н. Томилов, В.А. Чернухин, Д.А. Гончар, С.Х. Дегтярев // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова: Москва, 2006. – Т.2, № 3 – С. 29 – 39.
39. Гусейнов, О.А. Методы биохимических исследований: учеб.-метод. пособие к лаб. занятиям / Сиб. федерал. ун-т; сост. О. А. Гусейнов. - Красноярск: СФУ, 2012. – 46с.
40. Лагодич, А.В. Методы анализа нуклеиновых кислот: учеб.-метод. пособие для студентов биол. фак. / А. В. Лагодич, О.В. Лагодич. – Минск: БГУ, 2013. – 47с
41. Васильева, Л.Г. Выделение плазмидной ДНК и ее анализ методом горизонтального электрофореза в агарозном геле: методическое руководство для школы молодых ученых / Л. Г. Васильева. – Москва: Пушкино, 2016. – 6 с.
42. Сомма, М. Анализ образцов пищевых продуктов на присутствие генетически модифицированных организмов. Сессия 5. Электрофорез в агарозном геле / М. Сомма, М. Кверчи // Всемирная организация здравоохранения. Европейское бюро. – 13с.
43. Lucotte, G. Introduction to Molecular Cloning Techniques / G. Lucotte; F. Baneyx // Wiley-Blackwell. – 1993. – P.41.

44. Шлык-Кернер, О.В. Основы генетической инженерии: лабораторный практикум / О.В. Шлык-Кернер Ижевск: Удмуртский университет, 2012. – 56с.

45. Rasmussen, H.B. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis – a valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting / Rasmussen H.B. // InTech, 2012.

46. RFLP Method – Restriction Fragment Length Polymorphism [электронный ресурс] – режим доступа: <http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/RFLP.html> (Дата обращения 17.10.2015)

47. Пономарева, Н.С. Применение расстояний редактирования при биоинформационном анализе геномов для задач оценки состояния репродуктивной системы / Н.С. Пономарева, Г.Н. Реброва, Е.А. Колина // Фундаментальные исследования. – 2015. – №7. – С. 774 – 777.

48. Karger, A. Facts about E.coli: dimensions, as discussed in bacteria: Diversity of structure of bacteria / A. Karger, R. Stock // BMC Microbiology. – 2003. – Vol.12 – P. 229 – 234.

49. Vogt, R. L. Escherichia coli O157:H7 outbreak associated with consumption of ground beef / R. L. Vogt, L. Dippold // Public Health Rep. – 2002. – Vol.120 (2). – P.174–176.

50. Bentley, R. Biosynthesis of vitamin K (menaquinone) in bacteria / R. Bentley, R. Meganathan // Microbiol. Rev. - 1999. - Vol.46 (3). – P. 241–80.

51. Hudault, S. Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection / S. Hudault, J. Guignot, A. L. Servin // Gut. – 2001. – T.49, №. 1. – С. 47-55.

52. Thompson, A. I. E.coli Thrives in Beach Sands / A. I. Thompson, A. Andrea // Live Science. - 2007 - Vol.37. – P.137.

53. Cramm, R. Genomic View of Energy Metabolism in Ralstonia eutropha H16 / R. Gramm // J Mol Microbiol Biotechnology. - 2009. Vol.16. –P. 38–52.

режимдоступа:<http://www.bioprotech.com.tw/databank/DataSheet/DNARNAPuri/axyprep%20bacterial%20genogen%20DNA%20miniprep%20kit.pdf> (Дата обращения 23.10.2015)